

University of Groningen

## The basal forebrain cholinergic system

Gaykema, Ronald Petrus Albertus

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1992

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Gaykema, R. P. A. (1992). The basal forebrain cholinergic system: Organization of connections and long-term effects of lesions in the rat. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Samenvatting en conclusies

Het cholinerge systeem in de basale voorhersenen wordt gevormd door een aaneengesloten groep van kerngebieden waarin relatief grote zenuwcellen (20-50  $\mu\text{m}$  in doorsnede) voorkomen, die als cholinerg getypeerd zijn daar zij bij de prikkeloverdracht gebruik maken van de neurotransmitter acetylcholine. De kerngebieden liggen grotendeels in de basis van de voorhersenen en zijn onder te verdelen in het mediale septum, de diagonale band van Broca en de nucleus basalis van Meynert. De laatstgenoemde nucleus is bij de mens en andere primaten de omvangrijkste en stuurt zenuwuitlopers naar grote delen van de hersenschors (neocortex). In tegenstelling tot primaten is bij knaagdieren, waaronder ratten, deze kern niet duidelijk herkenbaar, doch liggen de cholinerge neuronen verspreid temidden van andere zenuwcellen in het ventrale en dorsale pallidum en de substantia innominata. Op grond van neocorticale verbindingen wordt dit diffuus kerngebied de nucleus basalis magnocellularis genoemd en is deze te beschouwen als homoloog aan de nucleus basalis van Meynert bij de mens.

De cholinerge prikkeloverdracht in het centrale zenuwstelsel werd reeds in het begin van de jaren '70 geassocieerd met geheugenfuncties, toen bleek dat anti-cholinerge farmaca het leervermogen bij mens en dier nadelig beïnvloedden. Een grote doorbraak in de belangstelling voor het cholinerge systeem kwam toen eind jaren '70 ontdekt werd dat bij dementie van het Alzheimer type sterke reducties in de hersenschors optreden van choline acetyltransferase, een enzym dat voor de synthese van acetylcholine zorgt. Spoedig werd in de nucleus basalis van Meynert, die naar de hersenschors projecteert, een omvangrijke zenuwceldegeneratie aangetroffen.

Circa vijf procent van alle mensen boven de 65 jaar in de westerse samenleving ontwikkelt dementie van het Alzheimer type, die gekenmerkt wordt door een progressief verloop van symptomen als geheugenverlies en verslechtering van cognitieve functies. Tevens komt een preseniele vorm voor die gekenmerkt wordt door een sneller en ernstiger verloop van de symptomen. Deze vorm wordt de ziekte van Alzheimer genoemd. De preseniele en seniele (seniele dementie van het Alzheimer type) varianten vertonen overeenkomstige pathologische veranderingen in de hersenen, waarvan de seniele "plaques" en neurofibrillaire kluwens de meest opvallende zijn. Deze, door Alois Alzheimer in 1907 voor het eerst beschreven, kleine lesies en restanten van afgestorven zenuwcellen komen in grote hoeveelheden voor in de cerebrale cortex en de hippocampus. Zij worden ook aangetroffen in de bovengenoemde en andere structuren die projecteren naar de cortex. Van de (postmortem vastgestelde) biochemische veranderingen bleek de afname van cholinerge enzymen het sterkst en het meest consistent te zijn en, evenals de dichtheid van de plaques en kluwens, te correleren met de ernst van de symptomen.

De mogelijk belangrijke rol van het cholinerge systeem in het cognitief verval alsook in de milde vergeetachtigheid bij normale veroudering, in 1982 geformuleerd in de cholinerge hypothese, leidde tot intensief onderzoek naar dit systeem. In het streven naar meer kennis van de anatomie en fysiologie van het cholinerge systeem en diens rol in leer- en geheugenprocessen zijn ook de grondslagen van dit dissertatie-onderzoek geworteld. De centrale vraagstellingen in dit proefschrift zijn hoe de verbindingen van cholinerge systeem zijn georganiseerd en hoe de anatomie van de

cholinerge projecties beïnvloed wordt door veroudering en door partiële degeneratie van de cholinerge neuronen. In het eerste en omvangrijkste deel van deze dissertatie worden de anatomische relaties van het cholinerge systeem in de basale voorhersenen met de cerebrale cortex beschreven. Met het tweede deel van het onderzoek is getracht meer inzicht te verwerven in de rol van het cholinerge systeem in de pathogenese van de ziekte van Alzheimer.

#### *De anatomie van het cholinerge systeem*

Retrograde tracing studies in proefdieren naar de verbindingen van het cholinerge complex in de basale voorhersenen met de cortex leverden in het begin van de jaren '80 als eerste een beeld op van de topografische organisatie van deze corticale projecties. Hierbij werd gebruik gemaakt van merkstoffen die in de zenuwvezeleindingen (in de cortex) worden opgenomen en retrograad naar de zenuwcellichamen (in de cholinerge kernen) getransporteerd worden. Verschillende onderdelen van het cholinerge systeem bleken ieder over specifieke doelgebieden in de hersenschors te beschikken, waarbij de topografische ordening bij apen en ratten onderling in grote lijnen overeen kwamen. Histochemische en immunocytochemische kleuringen van cholinerge enzymen toonden een dicht netwerk van cholinerge bevezeling in de gehele cortex alsmede de hippocampus, amygdala en de bulbus olfactorius. Dit netwerk vertoont sterk gelaagde patronen in de meeste cortextvelden en tevens regionale variaties in dichtheid.

Een beperkt aantal studies is verricht naar de aanvoerende verbindingen van het cholinerge systeem om een idee te krijgen of en zoja welke delen van de hersenschors de activiteit van de cholinerge projecties beïnvloeden. Hierbij is ook gebruik gemaakt van retrograad getransporteerde merkstoffen. Tevens werd hierbij de aandacht meestal gericht op een deel van het cholinerge complex, bijvoorbeeld de nucleus basalis.

Bij het onderzoek naar zowel de af- als de aanvoerende verbindingen ontbraken evenwel gedetailleerde studies met anterograde getransporteerde merkstoffen. Hiermee kan de regionale topografie, maar ook de lokale (laminare) distributie en de morfologie van projecties in kaart gebracht kan worden. Om in deze leemte te voorzien is in het eerste deel van dit dissertatie-onderzoek de organisatie van de verbindingen van het cholinerge systeem bestudeerd met behulp van anterograde tracing. Daarbij is aandacht besteed aan de topografische en de laminare ordening van de projecties van de basale voorhersenen naar de hersenschors. Bovendien is in dit onderzoek de topografische ordening van de aanvoerende verbindingen van de prefrontale cortex en de hippocampus naar de cholinerge celgebieden nader onderzocht.

#### *Experimentele cholinerge degeneratie en veroudering*

In het afgelopen decennium zijn een groot aantal studies verricht, waarin experimentele beschadigingen (lesies) werden gemaakt in de cholinerge nucleï om de effecten van cholinerge cel-destructie op het gedrag van de proefdieren in leer- en geheugen-taken vast te stellen. Deze lesies werden meestal gemaakt met neurotoxines (b.v. in de nucleus basalis) of door middel van het doorsnijden van de fornix en fimbria (de vezelbanen die het mediale septum met de hippocampus verbinden). De gemanipuleerde dieren bleken slechter te presteren in geheugentaken. Een aantal studies beschreef echter een herstel van de prestaties van de geletselde dieren en zelfs een

(gedeeltelijk) herstel van de biochemische functie. Het is verondersteld het gevolg te zijn van sprouting ("sprouting"). De incongruentie tussen de morfologie van de cholinerge projecties en de morfologie van de cholinerge cellen bij type dementie zou te maken kunnen hebben met het feit dat deze cellen niet nog beschikken over plastische mogelijkheden.

Het idee is ontstaan dat de studie van de ziekte van Alzheimer beter na te bootsen is door ingrepen in het oude dier is. Het eerste onderzoek de lange-termijn gevolgen van de morfologie in oude ratten met een cholinerge cortex van Alzheimer patiënten. Het onderzoek naar andere neurotransmitter systemen in de cortex dat zij aangedaan zijn in Alzheimer. Het onderzoek van deze systemen en die van de cholinerge lesie-veroudering-experimenten in de ziekte van Alzheimer.

#### *Gebruikte technieken*

Deze studie is gebaseerd op de gebruikte technieken in verschillende hersengebieden. De studie van de stof die na inbrenging in de hersenschors getransporteerd. De inbrenging van de overlevingstijd werden de ratten van fixativa (paraformaldehyde) en andere componenten). Na het onderzoek zichtbaar gemaakt met behulp van de gebruikte technieken. PHA-L bevatten kleuren dan de bron van de eveneens gekleurd. De studie van de elders in het hersenweefsel.

De immunocytochemische technieken, zoals choline acetyltransferase. Hierbij zijn andere, specifiek voor de cholinerge systemen.

De lesies zijn in de hersenschors. De hoeveelheid iboteenzuur in de hersenschors overmatig aktiveert, zodat de ziekte van deze ingreep behandeld. Na de studie gefixeerd (zie hierboven). De studie van de acetyltransferase, somatostatine.

(gedeeltelijk) herstel van de biochemische niveaus van de cholinerge enzymen. Dit laatste verschijnsel is verondersteld het gevolg te zijn van regeneratieve groei van de gespaarde cholinerge projecties ("sprouting"). De incongruentie met de symptomen en biochemische veranderingen bij de Alzheimer type dementie zou te maken kunnen hebben met het feit dat de gebruikte proefdieren jong zijn, en nog beschikken over plastische vermogens om de effecten van de lesies te compenseren.

Het idee is ontstaan om oudere dieren te letselen, om zo de pathologische condities van de ziekte van Alzheimer beter na te bootsen. Over neuro-anatomische en -chemische gevolgen van deze ingrepen in het oude dier is echter niets bekend. Om deze reden zijn in het tweede deel van dit onderzoek de lange-termijn gevolgen van nucleus basalis lesies voor de cholinerge vezeldistributie en -morfologie in oude ratten nader bestudeerd en vergeleken met de cholinerge bevezeling in de cortex van Alzheimer patiënten. Tevens is aandacht besteed aan effecten van de lesie op enkele andere neurotransmitter systemen in de cortex (somatostatine en neuropeptide Y), waarvan bekend is dat zij aangedaan zijn in Alzheimer dementie, om een eventuele causale relatie tussen de pathologie van deze systemen en die van het cholinerge systeem te vinden. Getracht is de relevantie van deze lesie-veroudering-experimenten te bepalen als model voor de neuropathologie van de ziekte van Alzheimer.

#### Gebruikte technieken

Deze studie is gebaseerd op experimenten bij ratten. Voor de analyse van de verbindingen tussen verschillende hersengebieden is gebruik gemaakt *Phaseolus vulgaris* leuco-agglutinine (PHA-L), een stof die na inbrenging in de hersenen door zenuwcellen wordt opgenomen en anterograd getransporteerd. De inbrenging geschiedde onder anesthesie met behulp van stereotaxie. Na één week overlevingstijd werden de ratten onder diepe anesthesie geperfundeed via het hart met een oplossing van fixativa (paraformaldehyde en glutaraaldehyde). Deze methode heeft als doel het weefsel via het bloedvatstelsel te doorstromen en zodanig snel te fixeren (chemische verankering van enzymen en andere componenten). Na het snijden van de hersenen in plakjes van 20 tot 40  $\mu\text{m}$  dik werd PHA-L zichtbaar gemaakt met behulp van een immunocytochemische kleuringstechniek. Hierbij wordt gebruik gemaakt van antilichamen die specifiek zijn opgewekt tegen PHA-L. Zenuwcellichamen die PHA-L bevatten kleuren dan roodbruin en geven de plaats van injectie aan. Deze cellichamen vormen de bron van de eveneens gekleurde PHA-L-positieve uitlopers (axonen en presynaptische eindigingen) elders in het hersenweefsel.

De immunocytochemische kleuringstechniek is ook gebruikt om specifieke eiwitten en peptiden, zoals choline acetyltransferase, somatostatine en neuropeptide Y, zichtbaar te maken. Hierbij zijn andere, specifiek tegen deze componenten opgewekte antilichamen gebruikt.

De lesies zijn in geanesteseerde ratten gemaakt door stereotactische infusies van zeer kleine hoeveelheden iboteenzuur in de nucleus basalis. Ibotenzuur is een neurotoxine die zenuwcellen overmatig activeert, zodat deze bezwijken. De dieren zijn op volwassen leeftijd (6-9 maanden) met deze ingreep behandeld. Na een periode van 16-24 maanden overleving zijn de ratten doorstroomd en gefixeerd (zie hierboven). De hersenen zijn vervolgens immunocytochemisch gekleurd op choline acetyltransferase, somatostatine en neuropeptide Y.





direct op zenuwceluitlopers in de neocortex die gemerkt zijn voor de aanwezigheid van de muscarinische acetylcholine receptor.

Hoofdstukken 5 en 6 handelen over de organisatie van de aanvoerende verbindingen van respectievelijk de prefrontale cortex en de hippocampus terug naar de cholinerge celgebieden in de basale voorhersenen. Verschillende delen van de prefrontale cortex en van de hippocampus projecteren naar verschillende delen van de cholinerge celgebieden, wijzend op een topografische differentiatie. De projecties van het mediale deel van de prefrontale cortex bereiken de rostromediale componenten van het cholinerge complex, d.i. het mediale septum en de verticale arm van de diagonale band van Broca. Het eindigingsgebied van meer laterale velden van de prefrontale cortex betreft meer caudolaterale delen van de cholinerge kernen, zoals de nucleus basalis. De verdeling van de hippocampale vezels in het mediale septum-diagonaal band complex wordt bepaald door de ligging van hun oorsprong langs de septotemporale (dorsoventrale) as van de formatio hippocampi. Het septale deel van de hippocampus projecteert naar de mediane raphe van het mediale septum en het meest rostrale deel van de verticale arm van de diagonale band van Broca. Het temporale deel van de hippocampus innerveert daarentegen de laterale delen van het mediale septum en de centrale en caudoventrale delen van de verticale arm van de diagonale band van Broca. Door middel van PHA-L anterograde tracing gecombineerd met immunocytochemische kleuring van choline acetyltransferase zijn met de lichtmicroscopie aanvoerende verbindingen aangetroffen die raken aan cellichamen en dendriten van de cholinerge zenuwcellen. Het bewijs voor directe (synaptische) contacten op deze cholinerge neuronen moet echter nog geleverd worden met de elektronenmicroscopie.

Uit de synthese van de hierboven beschreven resultaten blijkt dat zowel de afvoerende als de aanvoerende verbindingen van het cholinerge complex in de basale voorhersenen met de hersenschors topografisch geordend zijn. Elk compartiment van het cholinerge complex heeft dus een unieke combinatie van specifieke doelgebieden en corticale (en hippocampale) afferenten. Het is gebleken dat de topografische ordening van de afvoerende verbindingen en die van de aanvoerende verbindingen nauw met elkaar geassocieerd zijn. Er lijkt dus sprake te zijn van reciprociteit op subregionaal niveau. De resultaten van dit onderzoek onderbouwen de gedachte dat het cholinerge complex in de basale voorhersenen geen uniform en diffuus projectiesysteem is. Mede op grond van de diverse, in functie gedifferentieerde delen van de prefrontale cortex, duidt de anatomische differentiatie daarentegen op een functionele heterogeniteit van het cholinerge complex.

In hoofdstuk 7 worden de lange-termijn effecten van nucleus basalis lesies op de cholinerge bevezeling in de hersenschors beschreven. In deze studie zijn ratten op volwassen leeftijd geletselde en bereikten vervolgens een "bejaarde" leeftijd van 25-32 maanden. Eén van de effecten was een persistente en omvangrijke afname van de cholinerge bevezeling in de frontale en pariëtale velden van de neocortex (welke in hoofdstuk 2 als doelgebieden van de nucleus basalis zijn geïdentificeerd). Bovendien vertoonden de overgebleven vezels een groot aantal morfologische afwijkingen in de vorm van sterke zwellingen. Dergelijke aberraties werden slechts in geringe mate aangetroffen bij de cholinerge projecties in even oude, doch ongeletselde dieren. In jonge, al dan niet geletselde dieren

zijn deze aberraties niet gevonden. Het lijkt erop dat, na (onvolledige) degeneratie van de nucleus basalis, de resterende cholinerge vezels een sterk verhoogd risico lopen voor pathologische veranderingen bij veroudering ofwel na een zeer lange periode van cholinerge denervatie.

De lesie-geïnduceerde vezelzwellingen vertonen overeenkomsten met de vervormingen van cholinerge vezels in de hersenschors van patiënten met Alzheimer dementie. Gemeenschappelijke mechanismen kunnen derhalve ten grondslag liggen aan de morfologische afwijkingen in de geletselde oude rat en die in Alzheimer dementie. Een discrepantie is echter het ontbreken van seniele "plaques" in de ratten, terwijl aangedane zenuwvezels in Alzheimer dementie veelal deel uitmaken van deze plaques. De kwestie of degenererende vezels plaques veroorzaken, of dat juist het omgekeerde het geval is, is nog niet naar tevredenheid beantwoord.

De nucleus basalis lesies bleken bovendien een lange-termijn effect te hebben op de verdeling van de neuropeptiden somatostatine en neuropeptide Y in de hersenschors, zoals is beschreven in hoofdstuk 8. In het pariëtale veld van de neocortex bleek de dichtheid van vezels die deze neuropeptiden bevatten met respectievelijk 50% en 124% gestegen te zijn. Dit transsynaptisch effect staat in contrast met waarnemingen aan deze neuropeptiden in de cortex van Alzheimer patiënten. De somatostatine- en in mindere mate de neuropeptide Y-bevattende zenuwcellen ondergaan er degeneratieve veranderingen, samengaan met verminderde hoeveelheden biochemisch gemeten somatostatine.

Concluderend geven de resultaten van het lesie onderzoek aan dat de veroudering-variant van het nucleus basalis lesie model een aantal nieuwe verschijnselen laat zien, doch dat deze variant wat betreft de neuroanatomische en -chemische veranderingen slechts beperkte gelijkens toont met die in Alzheimer dementie. Het verschijnsel van versterkte vezelpathologie in het oude dier na een lesie kan een nieuwe aanknopingspunt leveren wat betreft de relatie van vezeldegeneratie met plaque-vorming in Alzheimer dementie. Het diermodel biedt bovendien een mogelijkheid om de mechanismen van vezelpathologie nader te bestuderen.

De cholinerge hypothese van cognitie-stoornissen bij veroudering en dementie heeft, via een decade van intensief onderzoek, geleid tot nieuwe inzichten in de anatomie, fysiologie en functies van het cholinerge systeem in de basale voorhersenen. De hoop op mogelijkheden om via therapieën met cholinerge farmaca substantiële verbeteringen bij dementie patiënten te bewerkstelligen heeft echter plaats gemaakt voor scepsis. Behandelingen van Alzheimer patiënten met pro-cholinergica (veelal cholinesterase remmers om de afbraak van acetylcholine te vertragen) hebben tot nu toe weinig resultaten opgeleverd. Er zijn een aantal redenen hiervoor aan te wijzen. Allereerst treedt in de ziekte van Alzheimer omvangrijke schade aan zenuwcellen op in bepaalde delen van de cerebrale cortex, juist die gebieden die een essentiële rol spelen in geheugenfuncties. Er is in feite sprake van verbreken van communicatielijnen tussen de cortexvelden onderling, wat een belangrijk deel van het verlies van cognitieve vermogens kan verklaren. Ten tweede is de precieze rol van het cholinerge systeem in de verschillende aspecten van cognitie nog onduidelijk. Na kritische evaluatie van de studies die de effecten van cholinerge lesies op gedrag beschrijven lijkt het systeem als geheel met name de alertheid van het dier te sturen. Er lijkt dus sprake te zijn van een ondersteunende in plaats van een doorslaggevende rol in geheugenfuncties.

Over de functionele rol van het cholinerge systeem in de organisatie van afgeleide functies van dit dissertatie-onderzoek gericht op gerichte manipulaties van de functies.

Over de functionele differentiatie van het cholinerge systeem in de basale voorhersenen is niet meer dan een tip van de sluier opgelicht. Het zou mogelijk kunnen zijn dat de cholinerge projecties naar de geheugencentra van de hersenschors wel een belangrijke invloed hebben op geheugenprocessen. Inhomogene uitvalspatronen van zenuwcellen binnen het cholinerge systeem zouden ten grondslag kunnen liggen aan variaties van klinische symptomen bij de dementie van Alzheimer en andere neurodegeneratieve aandoeningen. Om meer greep te krijgen op de complexe rol van het cholinerg systeem in geheugen en andere cognitieve processen is een gedetailleerde kennis van de organisatie van af- en aanvoerende verbindingen van het systeem onontbeerlijk. De resultaten van dit dissertatie-onderzoek over de organisatie van verbindingen kunnen als richtsnoer dienen voor gerichte manipulaties van bepaalde onderdelen van het systeem om zo meer inzicht te krijgen in diens functies.

Mijn promotoren Prof. Dr. Wim Nieuwenhuis en Prof. Dr. Anthony R.M. Luiten en de leden van de promotiecommissie Prof. Dr. J. Korf, Prof. Dr. R. Nieuwenhuis en Prof. Dr. R.H.M. Uylings, hen ik dank verschuldigd voor hun kritiek en aanbevelingen van het manuscript. Prof. Dr. Jaap Korf wil ik bovendien bedanken voor de ruimte die hij mij bood om het proefschrift af te maken naast mijn nieuwe werkzaamheden.

I would like to thank Drs. J. Traber, E. Harvath, and B.H. Spicker Jr. for their encouragement and support for this project, for the travel grant I received to travel to Leipzig and Badegast, and for the ibotenic-ionized rats. Dr. L.B. Hersh is acknowledged for his generous gift of the choline acetyltransferase antibodies.

De goede sfeer op de werkvloer heeft in ruime mate bijgedragen aan de productieve tijd die ik gehad heb. Met name de mensen in mijn directe werkomgeving wil ik bedanken, te weten: Hilde van der Zee, Glucke de Jong, Csaba Nyakas, en (in de verheffing van de 2e staat de 1e van de 2e) Bert Beldhuis, niet in de laatste plaats om de stimulerende discussies en gezellige koffiepauzes. Ook wil ik de warme collegialiteit en vriendschap van één van de weinige cholinerg-betrokken personen van buiten het dierfysiologisch lab, Peter de Boer niet onvermeld laten. Het dank je wel, jouw komst ben je een geweldige steun in de veelal tijdrovende labwerkzaamheden geweest, bedankt hiervoor. Zonder Anke Melissen's zorg voor de jonge en oude ratten waren de experimenten niet mogelijk geweest. Joke Poelstra wil ik bedanken voor het typen van de manuscripten uit de tijd dat p.c.'s en wordperfect nog geen gangbaar waren, en de heren Lerwings en Veen voor het vervaardigen van de vele aftekeningen en dia's. I would like to acknowledge the contributions of Csaba Nyakas, Gyongyi Gadi, Zoltan Molnar, Tomohiro Matsuyama and Mariko Yasuno. Ik wil de (ex)doctoraalstudenten Rob van Weeghel, Alwin Winkel, Erik Hummel, Josje Compans, Jan van der Kall, en Aaron Bestman bedanken voor hun bijdragen en wens ze, voor zover thans nog aan hun wetenschappelijke carrière, veel succes.

Ik bedank mijn vrienden, mijn familie alsook de familie van Willeke voor hun niet aftellende steun. Sas Dijk in het bijzonder voor het lezen van de laatste versies van mijn manuscript en voor zijn grenzeloos optimisme. Lieve Willeke, jouw betrokkenheid en belangstelling heeft een onmisbare uitwerking gehad op het totstand komen van dit proefschrift. Ik hoop dat ik hetzelfde voor jou mag gaan betekenen.